

Samuli Björk

# KARYOTYYPPITUTKIMUS

Kaupallisen testin toimivuus ihmisen indusoitujen  
monikykyisten kantasolujen karyotyyppimäärityksissä

Samuli Björk  
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Lääketieteen lisensiaatin syventävä työ  
Tammikuu 2020

# TIIVISTELMÄ

Samuli Björk: Karyotyyppitutkimus  
Syventävien opintojen opinnäytetyö  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen lisensiaatin tutkinto-ohjelma  
Tammikuu 2020

---

Soluviljelyn aikana ihmisen indusoituihin monikykyisiin kantasoluihin (hiPSC) voi syntyä spontaanisti kromosomipoikkeavuuksia (karyotyyppimuutoksia), jotka antavat soluille kasvuedun ja mahdollistavat muiden solujen syrjäyttämisen soluviljelymaljalla (Draper ym. 2004, Olariu ym. 2010). Karyotyyppimuutoksien aiheuttamat häiriöt kantasolujen toiminnassa voivat sekoittaa tutkimustuloksia (Baker ym. 2016), minkä vuoksi tieteelliset lehdet vaativat solulinjojen karyotyyppimääritykset, jotta päätulokset voidaan toistaa myöhemmissä tutkimuksissa luotettavasti (Engle ym. 2018). Aikaisemmin sydäntutkimusryhmä on voinut teettää karyotyyppimääritykset ulkopuolisella toimijalla Turussa mutta määritykset jouduttiin lopettamaan teknisten vaikeuksien vuoksi.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta määrittää karyotyypit jatkossa itse hyödyntäen kaupallista testiä *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit*. Kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (qPCR) perustuva kaupallinen testi lupaa mahdollisuutta tunnistaa yli 70 % yleisimmistä karyotyyppimuutoksista kantasoluviljelmissä. Tutkimusryhmä arvioi kaupallisen testin toiminnan opinnäytetyön perusteella, ja päättää hyödyntää tai olla hyödyntämättä kaupallista testiä ryhmän toiminnassa.

Tutkimus toteutettiin tutkimusryhmän omilla tai Heli Skottmanin Silmäryhmältä saaduilla solunäytteillä. Aineisto kattoi yhteensä 13 solunäytettä, joista lopulliseen analyysiin hyväksyttiin 12 solunäytettä. Solunäytteet edustivat 7:ää eri solulinjaa, ja niiden lisäksi käytettiin 5 kaupallisen testin kontrollinäytettä. Kaksi solulinjaa oli aikaisemmin todettu karyotyypeiltaan normaaleiksi, kahden solulinjan karyotyyppia ei ollut määritetty aiemmin ja kolmessa solulinjassa oli todettu karyotyyppimuutoksia. Sekä mies- että naissukupuoliset solulinjat olivat edustettuina otoksessa.

Kaupallinen testi testattiin tilastollisesti Fisherin tarkalla testillä SPSS-ohjelmalla:  $p=0,019$ . Kaupallisen testin herkkyudeksi todettiin 80,0 % (4/5), tarkkuudeksi 76,1 %, positiiviseksi ennustearvoksi (PPV) 20,0 % ja negatiiviseksi ennustearvoksi (NPV) 98,1 %. Ilman kaupallista testiä PPV oli 6,9 % ja NPV 93,1 %. Siten testin hyöty oli positiivisen ennustearvon osalta 13,1 %-yksikköä ja negatiivisen ennustearvon osalta 5,0 %-yksikköä. Karyotyyppimääritysten välillä tulosten toistettavuus oli 66,7 %. Sukupuolen tunnistus onnistui 83,3 prosenttisesti (10/12). Tuloksia voidaan pitää luotettavina sillä jokaisessa viidessä karyotyyppimäärityksessä kontrollinäytteet olivat normaaleita ja p-arvo oli alle 5 prosenttia.

Kaiken kaikkiaan tulokset olivat hyviä ja odotetun kaltaisia. Kaupallinen testi voidaan todeta toimivaksi hiPSC-solujen karyotyyppimäärityksissä. Hyvän herkkyuden ja negatiivisen ennustearvon ansiosta testillä voidaan suhteellisen luotettavasti poissulkea karyotyyppimuutos, mikäli testitulokset on negatiivinen. Tutkimukseen liittyy kuitenkin valikoitumisharhaa solunäytteiden korkeiden siirrostuslukujen takia, joten jatkotutkimusten tekeminen kaupallisella testillä on suositeltavaa.

Avainsanat: hiPSC, karyotyyppimuutos, kaupallinen testi, qPCR

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla Tampereen yliopiston laatuja järjestelmän mukaisesti.

# ABSTRACT

Samuli Björk: Karyotype study  
Thesis of Advanced Studies  
Tampere University  
Physiology, Heart Group  
Licentiate Degree Programme in Medicine  
January 2020

Chromosomal abnormalities may occur spontaneously in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) during prolonged cell culture. Chromosomal abnormalities may give a selective growth advantage to the hiPSCs and will lead to exclusion of other stem cells in the culture. (Draper et al. 2004, Olariu et al. 2010) Academic journals demand karyotyping of hiPSC lines in a study because of the interference caused by chromosomal abnormalities will cause a potential bias in the study. Without karyotyping, the results of a study cannot be reproduced reliably in other studies. (Engle et al. 2016) Previously karyotyping was purchased from a research group of University of Turku before technical problems.

Objective of this thesis was to find out if it would be possible for the Physiology, Heart Group (Tampere University) to karyotype hiPSC lines using a commercial kit called *Stemcell Technologies™ hPSC Analysis Kit*. Based on quantitative PCR (qPCR) the kit is advertised to be able to detect over 70 % of the most common chromosomal abnormalities appearing in human stem cell cultures. The thesis is evaluated by the Physiology, Heart Group who will decide if the kit is used as a karyotyping method for hiPSCs.

The thesis was performed using research group's own hiPSC samples or samples from Heli Skottman's Eye Group from Tampere University. Eventually, 12 hiPSC samples were chosen out of 13 samples which represent 7 different hiPSC lines. In addition, 5 control samples included in the kit were used. Beforehand chromosomal abnormalities were detected in 3 different cell lines, karyotype had not been previously determined for 2 cell lines and normal karyotype was detected in 2 cell lines. Both male and female cell lines were included in the samples.

The kit was statistically tested using Fisher Exact Test in SPSS:  $p = 0.0191$ . Sensitivity of the kit was 80.0 % (4/5), specificity 76.1 %, positive predictive value (PPV) 20.0 % and negative predictive value 98.1 %. Without the kit the PPV was 6.9 % and NPV was 93.1 %. Thus, the usefulness of the kit was 13.1 % and 5.0 % with respect to PPV and NPV. Reliability of the results was 66.7 % and sex determination performance was 83,3 % (10/12). The results may be considered solid because of the p-value below 0.05 and because of the 5 control samples were determined correctly in every one of the 5 analysis.

Taken together, the results were decent and met the expectations. The kit is proven to be useful for karyotyping hiPSC lines. Due to the fine sensitivity and excellent negative predictive value, chromosomal abnormalities can be excluded with a high certainty if the test result is negative. Nonetheless, a potential selection bias caused by high passages of hiPSC samples is linked to this thesis. Future research with wider range of passages is advised to confirm the results.

Keywords: hiPSC, chromosomal abnormality, kit, qPCR

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin Originality Check service in accordance with the Tampere University quality system.

# ALKUSANAT

Tämä opinnäytetyö on suoritettu Tampereen yliopiston Kaupin kampuksella Sydäntutkimusryhmässä.

Haluan kiittää professori Katriina Aalto-Setälää mielenkiintoisen aiheen tarjoamisesta ja työni ohjauksesta. Kiitän myös FT Leena Viiriä työni toisena tarkastajana toimimisesta. Erityiskiitos kuuluu Markus Haposelle ja Henna Lapille avusta työn käytännön osan suorituksessa.

Tampereella, 26.1.2020

Samuli Björk

# SISÄLLYSLUETTELO

1.JOHDANTO.....	1
2.AINEISTO JA MENETELMÄT .....	6
2.1  Aineisto .....	6
2.2  Solujen eristys soluviljelmästä .....	7
2.3  DNA:n eristys soluista.....	7
2.4  DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen .....	8
2.5  Kvantitatiivinen PCR.....	9
2.6  Raakadatan käsittely .....	10
2.7  Karyotyypin määrittäminen.....	11
2.8  Tulosten tilastollinen testaus.....	11
3.TULOKSET .....	12
4.POHDINTA.....	16
LÄHTEET.....	19

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

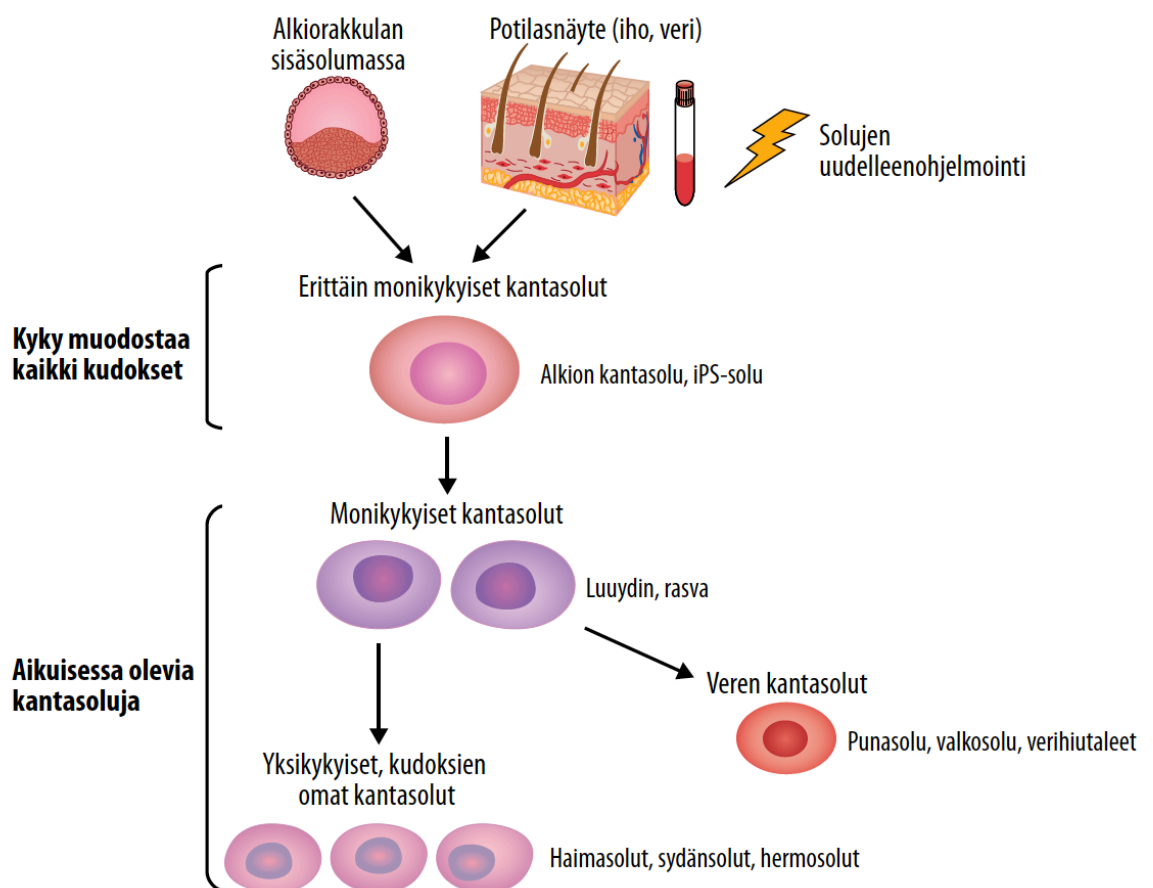
5-FAM	fluoresoiva väriaine 5-karboksifluoresiini
CGH	engl. Comparative Genomic Hybridization, sytogeneettinen analyysimenetelmä
Cq	engl. quantification cycle, qPCR:n kynnysarvo
DPBS	Dulbeccan fosfaattipuskuroitu suolaliuos
df	engl. degrees of freedom (vapausaste), tilastotieteessä niiden muutujien määrä, joka voi vaihdella
FISH	engl. Fluorescence In Situ Hybridization, sytogeneettinen analyysimenetelmä
G-raitavärjäys	perinteinen värjäysmenetelmä karyotyypin tutkimiseksi
hESC	engl. human Embryonic Stem Cell, ihmisalkion kantasolu
hiPSC	engl. human induced Pluripotent Stem Cell, ihmisen indusoitu kantasolu
iPS-teknologia	engl. induced Pluripotent Stem Cell technology, soluteknologia aikuisen somaattisen solun uudelleenohjelmoimiseksi kantasoluksi
MEF	engl. Mouse Embryonic Fibroblast, hiiren alkion kantasolu
MilliQ	erikoispuhdas vesi laboratorikäyttöön
NPV	engl. Negative Predictive Value, negatiivinen ennustearvo
p-arvo	engl. probability value, tilastollisessa testauksessa käytetty testisuure
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction, polymeraasiketjureaktio
PPV	engl. Positive Predictive Value, positiivinen ennustearvo
qPCR	engl. quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
RFU	engl. Relative Fluorescence Unit, suhteellinen fluoresenssiyksikkö
ROX	passiivinen fluoresenssiväriaine 5-karboksi-X-rodamiini
Tris/HCl	Trishydroksimetyyliaminometaani/suolahappo-puskuriliuos
$\chi^2$ -testi	Khiin neliö -testi

# 1. JOHDANTO

Ihmisen indusoidut monikykyiset kantasolut (hiPSC) muodostavat perustan nykyiselle lääkekehitykselle, regeneratiiviselle lääketieteelle ja tautimallinnukselle (Takahashi ym. 2007). Esimerkiksi Katriina Aalto-Setälän johtaman sydänryhmän tärkein tavoite on erilaistaa toiminnallisia sydänlihassoluja soluviljelyistä hiPSC-soluista ja hyödyntää iPS-soluteknologiaa geneettisten sydänsairauksien mallinnuksessa (Sydänryhmä. Tietoa tutkimusryhmästä. [www.tuni.fi](http://www.tuni.fi)). Ongelmana on, että soluviljelyn aikana monikykyisiin kantasoluihin voi syntyä spontaanisti kromosomipoikkeavuuksia (karyotyypinmuutoksia), jotka antavat soluille kasvuedun ja mahdollistavat muiden solujen syrjäyttämisen soluviljelymaljalla (Draper ym. 2004, Olariu ym. 2010). Karyotyypinmuutoksien aiheuttamat häiriöt solujen toiminnassa voivat sekoittaa tutkimustuloksia (Baker ym. 2016) tai ne voivat mahdollisesti aiheuttaa syöpää, mikäli soluja käytetään tulevaisuudessa terapeuttisissa hoidoissa (Ben-David ym. 2014). Karyotyypinmuutosten havaitsemiseksi on kehitetty monia menetelmiä, jotta hiPSC-soluja voidaan käyttää luotettavasti ja turvallisesti sekä tieteellisessä tutkimuksessa että terapeuttisissa hoidoissa. Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan kaupallista testiä *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit* indusoitujen monikykyisten kantasolujen karyotyypinmäärityksissä.

iPS-soluteknologialla voidaan tuottaa hiPSC-soluja mistä tahansa aikuisen erilaistuneista (somaattisista) soluista. Teknologia perustuu somaattisen solun kuten ihon epiteelisolun, sidekudoksen fibroblastin tai veren leukosyytin uudelleenohjelmointiin, mikä tapahtuu viemällä siihen alkion kantasoluille (hESC) tärkeitä tekijöitä (ns. Yamanakan faktoreita) kuten OCT4, KLF4, SOX2 ja c-Myc (Weltner ym. 2014). Uudelleenohjelmoidut hiPSC-solut muistuttavat hyvin läheisesti hESC-soluja, joita voidaan eristää alkion sisäsolumasta mutta hiPSC-solut sisältävät identtisen kopion potilaan perimästä. Monikykyiset kantasolut (hPSC), joita ovat sekä hiPSC- että hESC-solut, voidaan erilaistaa miksi tahansa yksilön solutyypiksi, kuten haimasolut, sydänsolut tai hermosolut (Kuva 1). Erilaistettuja soluja voidaan hyödyntää lääkekehityksessä, regeneratiivisissa hoidoissa tai tautimallinnuksessa, sillä ne ilmentävät karyotyypinmuutoksista johtuvia toimintahäiriötä, joita ovat esimerkiksi erilaiset perinnölliset sydänsairaudet kuten perinnöllinen kammiotakykardia tai pitkä QT-oireyhtymä. Lisäksi hiPSC-solujen käyttöön ei liity samanlaisia alkion solujen hyödyntämiseen liittyviä eettisiä ongelmia kuin hESC-solujen käyttöön, vaikka myös niillä

on eettisiä ongelmia kuten käyttö kloonauksessa, sukusolujen tuotto tai alkioiden tuotto (Kankuri ym. 2014, Zheng 2016). Tutkimusryhmällä on eettisen toimikunnan lupa ihmisperäisten solujen käytölle, ja lisäksi tutkittavat solulinjat on pseudonymisoitu. Kuitenkin koska hiPSC- ja hESC-solut muistuttavat erilaistumiskyvyltään ja karyotyypimuutoksiltaan hyvin paljon toisiaan (Taapken ym. 2011), on perusteltua viitata molempia kantasolutyyppejä koskeviin tutkimuksiin tässä opinnäytetyössä.



**Kuva 1.** Monikykyisten kantasolujen (hPSC) kyky muodostaa erilaisia kudostyyppejä (Kankuri ym. 2014).

Kuten aikaisemmin todettiin, soluviljelyn aikana kantasoluihin voi syntyä spontaanisti karyotyypimuutoksia (Olariu ym. 2010). Karyotyypimuutokset yleistyvät siirrostusluvun (passage) kasvaessa mutta niitä voi esiintyä myös matalilla siirrostuslukuilla ja toisaalta normaaleja karyotyyppejä tavataan myös korkeilla siirrostuslukuilla (Taapken ym. 2011). Tutkimusten mukaan karyotyypimuutokset ovat yleisempiä entsyymaattisesti siirrostetuilla kantasoluilla tai ilman MEF-tukisoluja kasvatetuilla (feeder-free) kantasoluilla (Bai ym. 2015, Garitaonandia 2015, Catalina 2008). Karyotyypimuutos voi antaa solulle selviytymisedun, mikä edesauttaa solun lisääntymistä viljelymaljalla ja mahdollistaa muiden solujen syrjäyttämisen (Draper ym. 2004). Selviytymisetu voi olla



esimeriksi ohjelmoidun solukuoleman (apoptoosi) resistenssi, vähentynyt kasvutekijöiden tarve tai erilaistumiskyvyn muutos (Yang ym. 2008, Werbowetski-Ogilvie ym. 2009, Fazeli ym. 2011).

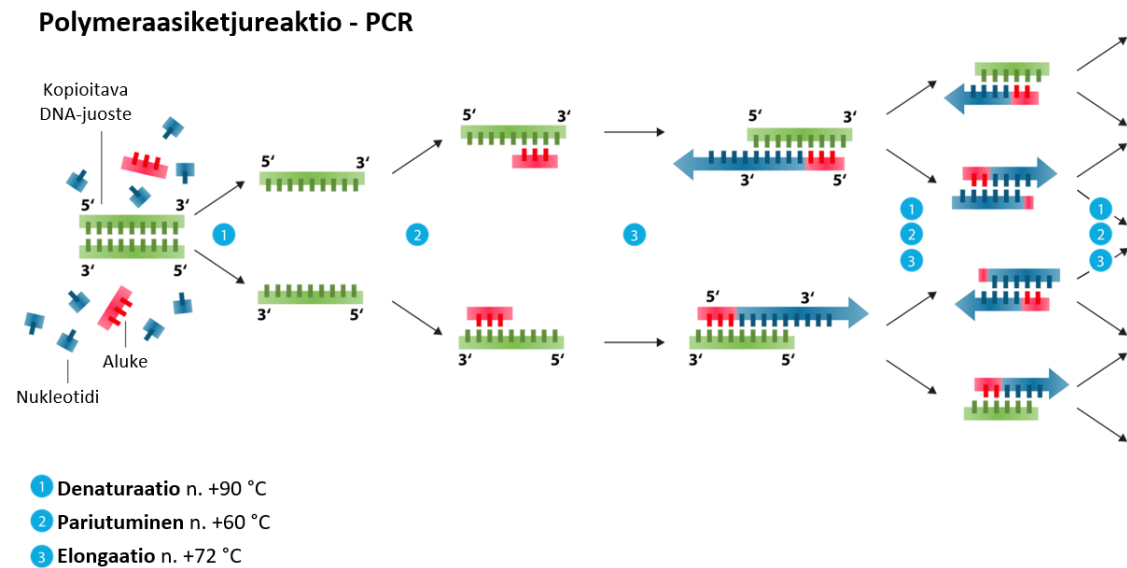
Ihmissoluissa (pl. sukusoluissa) on normaalisti kaksinkertainen (diploidinen) peruskromosomisto, johon kuuluu 23 kromosomiparia (Lääketieteen sanasto. Diploidi(nen). [www.terveyskirjasto.fi](http://www.terveyskirjasto.fi)). Kromosomipari 23 muodostuu sukupuolikromosomeista, jotka ovat naisella XX ja miehellä XY. Muut 22 kromosomiparia ovat ns. autosomaalisia eli eivät vaikuta sukupuolen määräytymiseen. (Tenhunen ym. 2004)

Yleisimmät hiPSC-solujen karyotyypinmuutokset esiintyvät kromosomeissa 8, 12, 20 ja X, joista kromosomien 8 ja 12 trisomiat ovat vallitsevimpia. Muut yleiset karyotyypinmuutokset ovat kromosomialueen 12p kahdentuma (duplikaatio) sekä kromosomien 20q ja X trisomiat. (Taapken ym. 2011) Ei tarkkaan tiedetä, miksi juuri nämä karyotyypinmuutokset yleistyvät siirrostusluvun kasvaessa tai mitkä geenit kyseisissä kromosomeissa antavat solulle selviytymisedun. Tiedetään kuitenkin, että selviytymisedun ja syövän karyotyypinmuutokset tapahtuvat samoilla kromosomialueilla sillä karyotyypinmuutos voi monistaa syöpägeenejä (onkogeenejä) ja/tai poistaa kasvunrajoitegeenejä (tuumorisuppressiogeenejä) (Wang ym. 2002). Esimerkiksi kromosomivarren 20q monistuma yliekspressoi BCL2L1-geeniä, mistä seuraa resistenssi apoptoosille. (Amps ym. 2011) BCL2L1-geeni on yhdistetty myös kasvainsolujen määrän kasvuun (proliferaatio) (Beroukhi ym. 2010).

Karyotyypinmäärittämiä voidaan tehdä useilla eri menetelmillä kuten komparatiivinen genomihybridisaatio (CGH), fluoresenssi in situ -hybridisaatio (FISH), mikrosirut ja G-raidoit (Wang ym. 2002) sekä kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (qPCR). Tässä opinnäytetyössä käytettävä qPCR on nopea, tarkka ja herkkä menetelmä karyotyypinmuutosten havaitsemiseksi. Karyotyypinmuutokset voidaan tunnistaa qPCR:llä, mikäli niitä esiintyy vähintään 10 prosentilla tutkittavista soluista. On kuitenkin epäselvää kuinka herkästi qPCR löytää lieviä karyotyypinmuutoksia. (Baker ym. 2016)

Polymeerasiketjureaktio (PCR) perustuu toistuviin sykleihin, joissa DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti, kun lämpötilaa vuoroin nostetaan ja lasketaan (Kuva 2). Lopulta reagenssien, kuten alukkeiden tai nukleotidien puute pysäyttää polymeerasiketjureaktion ja saavutetaan tasaantumisvaihe (plateau-vaihe). Reaktion aluksi lämpötila nostetaan n. +90 °C:een, jolloin DNA-juosteet irtoavat toisistaan (denaturaatio). Sitten lämpötila lasketaan n. +60 °C:een, jolloin alukkeet pariutuvat vastinalueidensa kanssa ja rajaavat monistettavan alueen DNA:n 5'- ja 3'- päistä. Viimeisessä vaiheessa lämpötila nostetaan n. +72 °C:een, jolloin lämmönkestävä DNA-polymeeraasi (Taq-polymeeraasi) muodostaa

vastinjuosteen (komplementaarisen DNA:n) alukkeiden rajaamalle alueelle templaatti-DNA:ssa (elongaatio-vaihe). (qPCR Guide. [www.eurogentec.com](http://www.eurogentec.com))



**Kuva 2.** Polymeraasiketjureaktion vaiheet (mukailtu kohteesta *Polymerase Chain Reaction*. <https://en.wikipedia.org>)

Kvantitatiivinen PCR mahdollistaa DNA:n määrän reaaliaikaisen seurannan. qPCR perustuu fluoresoiviin merkkiaineisiin, jotka sitoutuvat joko epäspesifisti tai spesifisti DNA:han ja lähettävät ultraviolettivaloa. Tässä opinnäytetyössä hyödynnetään fluoresoivana merkkiaineena 5-karboksifluoresiinia (5-FAM), joka on koettimeen sidottu (spesifi) merkkiaine. Fluoresenssi eli fluoresoivien merkkiaineiden lähettämä ultraviolettivalo kasvaa samassa suhteessa kuin DNA:n määrä. Aluksi polymeraasiketjureaktiossa fluoresenssi peittyy taustakohinan alle, sillä DNA:ta on vähän. Reaktion edetessä fluoresenssi kasvaa eksponentiaalisesti samalla, kun DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti. DNA-näytteiden välillä nähdään eroja nimenomaan eksponentiaalisen kasvun aikana sillä karyotyyppimuutosten takia templaatti-DNA:ta on eri lähtömäärä eri näytteissä. qPCR-laite määrittää templaatti-DNA:n määrän automaattisesti sen perusteella, kuinka monen PCR-syklin jälkeen fluoresenssin kynnysarvo (engl. threshold) ylittyy. Kynnysarvoa kutsutaan myös nimellä Cq (quantification cycle). (Kubista ym. 2006)

Sen lisäksi, että muutokset karyotyypissä voivat vaikuttaa tutkimustulokseen, myös tieteelliset lehdet vaativat solulinjojen karyotyyppimäärytykset, jotta päätulokset voidaan toistaa myöhemmissä tutkimuksissa luotettavasti (Engle ym. 2018). Tutkimusryhmä on aikaisemmin teettänyt karyotyyppaukset Turussa mutta ne lopetettiin teknisten vaikeuksien vuoksi. Nykyisin tutkimusryhmällä on mahdollisuus teettää karyotyyppimäärytyksiä

Tampereen Fimlabissa, jossa hyödynnetään G-raitavärijäystekniikkaa. Olisi kuitenkin kätevämpää ja edullisempaa, jos tutkimusryhmä voisi tehdä itse karyotyypin määrityksiä rutiininomaisesti. Kalliimpaa ja tarkempaa G-raitavärijäystä voitaisiin käyttää julkaisuja varten, kun karyotyypin määrityksiltä vaaditaan parempi tarkkuus.

Edellä mainitun vuoksi tutkimusryhmä on päättänyt tutkia mahdollisuutta määrittää karyotyypit jatkossa itse hyödyntäen kaupallista testiä *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit*. Testin toiminta perustuu qPCR:ään ja yksi kaupallinen testi mahdollistaa 20 DNA-näytteen analysoimisen triplikaattina. Testi sisältää yhdeksän aluke-koe-  
tin-paria, jotka pariutuvat seuraavien kromosomialueiden kanssa: 1q, 4p, 8q, 10p, 12p, 17q, 18q, 20q ja Xp. Fluoresoivana väriaineena toimii 5-karboksifluoresiini (5-FAM) ja passiivisena referenssivärinä 6-karboksi-X-rodamiini (ROX). Testillä pitäisi pystyä tunnistamaan yli 70 prosenttia yleisimmistä kromosomipoikkeavuuksista hiPSC- ja hESC-soluviljelmissä mutta ei ole saatavilla tietoa, mihin spesifeihin geenilokuksiin alukkeet kiinnittyvät. (hPSC Genetic Analysis Kit. Overview. [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)) Tutkimustarkkuus vastaa kuitenkin aiemmin Turussa tehtyjä karyotyypin määrityksiä ja on siten hyvä tutkimusryhmän tarpeisiin. Tutkimuskysymykseksi muotoutui: "Voidaanko kaupallisella testillä määrittää luotettavasti ja rutiininomaisesti hiPSC-solulinjojen karyotyyppi?" Hypoteesin mukaan voidaan sillä aikaisempi tutkimustieto puoltaa testin toimivuutta ja tutkimus voidaan toteuttaa hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen.

## 2. AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimus toteutettiin Tampereen yliopiston Kaupin kampuksella. Käytössä oli tutkimusryhmän omia ja Heli Skottmanin Silmäryhmältä saatuja solunäytteitä. Työskentely tapahtui laboratoriossa aseptisesti. Karyotyypinmäärityksiä varten DNA eristettiin pakasteista tai viljellyistä soluista kaupallisella menetelmällä *Macherey-Nagel™ DNA, RNA and protein purification*, ja DNA:n pitoisuus sekä puhtaus määritettiin *Thermo Scientific™ NANODROP™ 2000* -spektrofotometrillä. Karyotyypinmääritykset tehtiin opinnäytetyössä tutkittavalla testillä *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit*. Saatu raakadata käsiteltiin *Bio-Rad CFX Manager* -ohjelmalla. Käsitelty raakadata tallennettiin Exceliin ja siirrettiin selainpohjaiselle *Stemcell Technologies™ Genetic Analysis Tool* -ohjelmalle analysoitavaksi. Ohjelma laski karyotyypinmuutokset automaattisesti ja ilmoitti tulokset sekä sanallisesti että pylväskaaviaina, jotka käsiteltiin sopivaan muotoon Excelillä. Tulosten tilastollinen testaus suoritettiin *SPSS-ohjelmalla* Fisherin tarkalla testillä.

### 2.1 Aineisto

Aineistoksi pyrittiin valitsemaan solulinjoja, joissa on tunnistettuja karyotyypinmuutoksia. Aineistona toimi yhteensä 13 tutkimusryhmän solunäytettä ja 5 kaupallisen testin kontrollinäytettä. Solunäytteet olivat alkuperältään ihopistosnäytteistä saatuja ihon fibroblasteja, jotka oli uudelleenohjelmoitu hiPSC-soluiksi iPS-soluteknologialla. Ne edustivat 7:ää eri solulinjaa, jotka ovat 03412.LQT2, 11104.EURCAs, 14301.ScN5Ap, 14303.ScN5Ap, 04511.WTs, 08/017 ja 07/046. Taulukossa 1 on esitetty solulinjoissa esiintyvät karyotyypinmuutokset, niiden sukupuolet sekä karyotyypinmääritysten aikaiset

**Taulukko 1.** Solulinjoissa esiintyvät karyotyypinmuutokset

Tutkittava solulinja	Sukupuoli	Aiemmin havaittu karyotyypinmuutos
03412.LQT2 (p49)	mies (46XY)	normaali karyotyyppi (p29)
04511.WTs (p24)	mies (46XY)	normaali karyotyyppi (p30)
14301.ScN5Ap (p45)	nainen (XX)	*
14303.ScN5Ap (p50)	nainen (XX)	*
11104.EURCAs (p28(5))	nainen (46XX)	chr20q1 amplifikaatio (p27)
08/017 (p26)	nainen (46XX)	chr10q ja chrXq deleetio (p23)
07/046 (p64)	nainen (46XX)	chr 3, 5, 7, 8, 12, 18, X muutos (p58)

\*Karyotyyppiä ei ole aiemmin määritetty.

siirrostusluvut (passage-luvut). Taulukosta 1 nähdään, että normaali 46:n kromosomin karyotyyppi oli entuudestaan solulinjoilla 03412.LQT2 ja 04511.WTs, jotka ovat miessukupuolisia solulinjoja. Naispuolisten solulinjojen 14301.ScN5Ap ja 14303.ScN5Ap karyotyyppiä ei ole aiemmin määritetty. Linjoja hyödynnetään kaupallisen testin toistettavuuden tutkimiseen, kun niille tehtyjä karyotyyppimääryksiä verrataan keskenään. Solulinjat 11104.EURCAs, 08/017 ja 07/046 ovat naissukupuolisia solulinjoja, joissa esiintyy yleisimpiä karyotyyppimuutoksia kromosomeissa 8, 12, 20 ja X sekä vähemmän yleisiä karyotyyppimuutoksia kromosomeissa 3, 5, 7, 10 ja 18.

## 2.2 Solujen eristys soluviljelmästä

Tutkimuksen menetelmät vaihtelivat hieman sen mukaan, mikä oli hiPSC-solujen lähtötilanne, pakkasessa vai soluviljelmässä. Soluviljeltyjä hiPSC-soluja oli kahdella eri tavalla kasvatettuna: MEF-tukisolujen (hiiren alkion ihon fibroblastien) päällä kasvatettuna sekä ilman MEF-tukisoluja kasvatettuna (feeder-free). Työskentelyssä noudatettiin aseptista työskentelytapaa ja työ tapahtui laminaarikaapissa soluviljelylaboratoriossa.

Aluksi havainnoitiin solujen määrä valomikroskoopin 20-kertaisella suurennoksella. Mikäli hiPSC-solut oli kasvatettu MEF-solujen päällä, niistä irrotettiin MEF-solukerros valomikroskoopin alla. Irrotus tapahtui raaputtamalla MEF-solut pois hiPSC-solujen muodostamien kolonioiden ympäriltä 10 µl:n ilmamäntäpipetin kärjellä. Feeder-free-menetelmällä kasvatetut solut ohittivat tämän vaiheen. Viljelymedium (ja siinä kelluneet MEF-jäännökset) imettiin pois imupipetillä. Solut irrotettiin solumaljalta DPBS-pesuliuoksella (Dulbeccan fosfaattipuskuroitu suolaliuos) ja mekaanisesti soluraaputtimella. DPBS poistettiin sentrifugoimalla ja irrotetut solut suspensioitiin 80 µl:n lopputilavuuteen Lysis Buffer T1 -liuosta (*Macherey-Nagel™ DNA, RNA and protein purification* -pakkaus). Jos solut oli pakastettu nestetyyppeen, ne sentrifugoitiin pakastusliuoksen poistamiseksi ja liuotettiin suoraan 80 µl:n lopputilavuuteen Lysis Buffer T1 -liuosta.

## 2.3 DNA:n eristys soluista

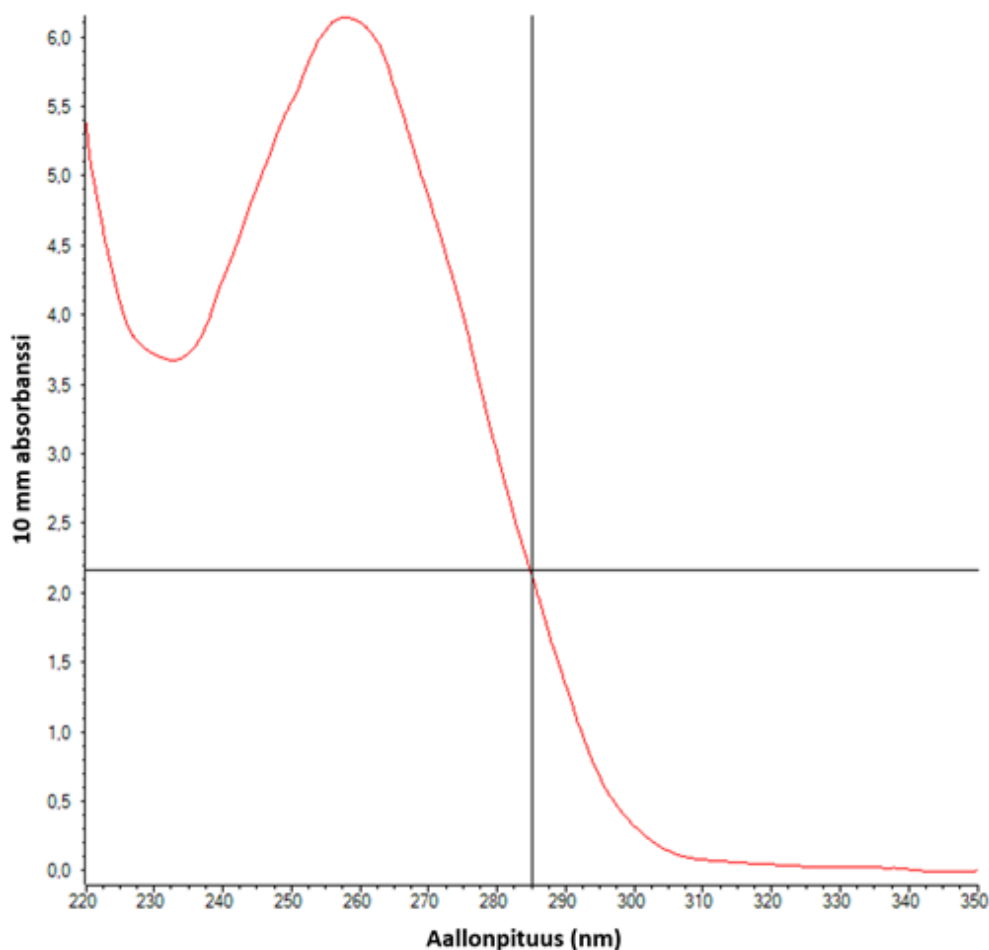
DNA eristettiin kaupallisella menetelmällä *Macherey-Nagel™ DNA, RNA and protein purification*. Kaupallinen menetelmä perustuu spin column -tekniikkaan eli DNA:n sitoutumiseen silikasuodatinkalvoon (SiO<sub>2</sub>) tietyissä olosuhteissa. Menetelmään kuuluu neljä vaihetta, jotka ovat solujen hajotus (lyysi), DNA:n sitoutuminen, DNA:n pesu ja DNA:n irrotus (eluutio). (User Manual. Genomic DNA from tissue. [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com))

Aluksi solut hajotettiin Proteinaasi K:lla, joka on laajakirjoinen proteinaasientsyymi. Proteinaasi K paljastaa DNA:n pilkkomalla solukalvon ja tumakotelon komponentteja. (Hilz

ym. 1975) Seuraavaksi säädettiin sopivat olosuhteet, jotta DNA sitoutuisi silikasuodatinkalvoon. Liuokseen lisättiin absoluuttista alkoholia (ETAX Aa) ja puskuliuosta, joka sisälsi kaotrooppista suolaa (guanidiinihydrokloridi). Etanoli ja kaotrooppinen suola edistävät DNA:n sitoutumista silikapartikkeihin, ja kaotrooppinen suola myös estää DNA:ta hajottavien nukleaaasien toimintaa. (Boom ym. 1995) DNA sidottiin silikasuodatinkalvoon sentrifugoimalla, mikä pakotti suspension virtaamaan silikasuodatinkalvon läpi. Vain DNA tarttui suodatinkalvoon, muut liuoksen komponentit läpäisivät sen. Seuraavaksi DNA pestiin puskuriliuoksella (Wash Buffer B5), joka poisti epäpuhtaudet silikasuodatinkalvolta, mutta ei irrottanut DNA:ta. Lopuksi DNA irrotettiin silikasuodatinkalvolta 20 µl:lla eluutiopuskuria (5 mM Tris/HCl, pH = 8,5) ja kerättiin talteen puhtaaseen eppendorf-putkeen. (User Manual. Genomic DNA from tissue. [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com))

## 2.4 DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen

DNA:n puhtaus ja pitoisuus määritettiin *Thermo Scientific™ NANODROP™ 2000* -spektrofotometrillä (Kuva 3). Spektrofotometrin toiminta perustuu valon imeytymiseen (absor-



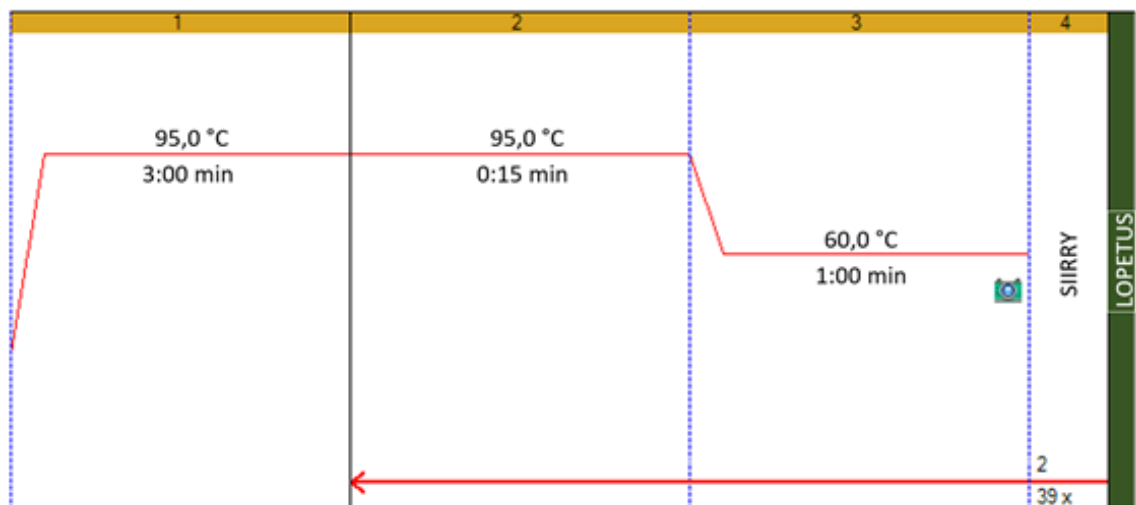
**Kuva 3.** NanoDrop™ 2000 -spektrofotometrille ominainen kuvaaja, jossa absorbanssi on esitetty aallonpituuden funktiona.

banssiin) DNA:han. Kuvassa 3 nähdään tyypillinen kuvaaja *NANODROP™ 2000* -spektrofotometrillä, josta käy hyvin ilmi, että DNA absorboi valoa eniten aallonpituudella 260 nm. DNA-näytteessä esiintyvät epäpuhtaudet kuten fenolit ja proteiinit, absorboivat valoa puolestaan aallonpituudella 280 nm. Aallonpituuksien suhteesta  $A_{260}/280$  voidaan päätellä DNA:n puhtaus sillä tiedetään, että puhtaalle DNA:lle suhde on 1,8. (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) Tässä opinäytetyössä DNA:ta pidettiin riittävän puhtaana, tutkimusryhmän aikaisemman kokeuksen perusteella, kun  $A_{260}/280$ -suhde oli välillä 1,80–2,20. DNA-pitoisuus katsottiin riittävän suureksi, kun se oli vähintään 5 ng/μl sillä matala DNA-pitoisuus lisää vaihtelua qPCR-triplikaattien välillä (hPSC Genetic Analysis Kit Technical Tips & Tricks. [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com))

Määrityksen jälkeen näytepaikka ja sen päällä oleva varsi pyyhittiin laboratoriapaperilla, jotta MilliQ-jäämät saatiin poistettua. Seuraavaksi DNA-näytettä, joka oli vortexoitu lyhyesti, pipetoitiin 1,5 μl näytepaikkaan. Spektrofotometri analysoi DNA-näytteen läpi kulke-  
neen valon ja ilmoitti tulokset ( $A_{260}/280$ -suhde, DNA-pitoisuus) tietokoneen ruudulla. Tulokset tallennettiin Exceliin.

## 2.5 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivinen PCR (qPCR) tehtiin tässä opinäytetyössä tutkittavalla kaupallisella testillä *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit* ja reaaliaikaisella qPCR-termosyklerillä *Bio-Rad CFX384* tai *Bio-Rad CFX96*. qPCR:n työvaiheisiin kuului reagenssien (DNA Master Mix, ROX, alukkeet) ja DNA-näytteiden valmistelu, niiden pipetointi qPCR-levylle sekä qPCR:n ajo termosyklerissä. Kuvassa 4 on esitetty työssä käytetty



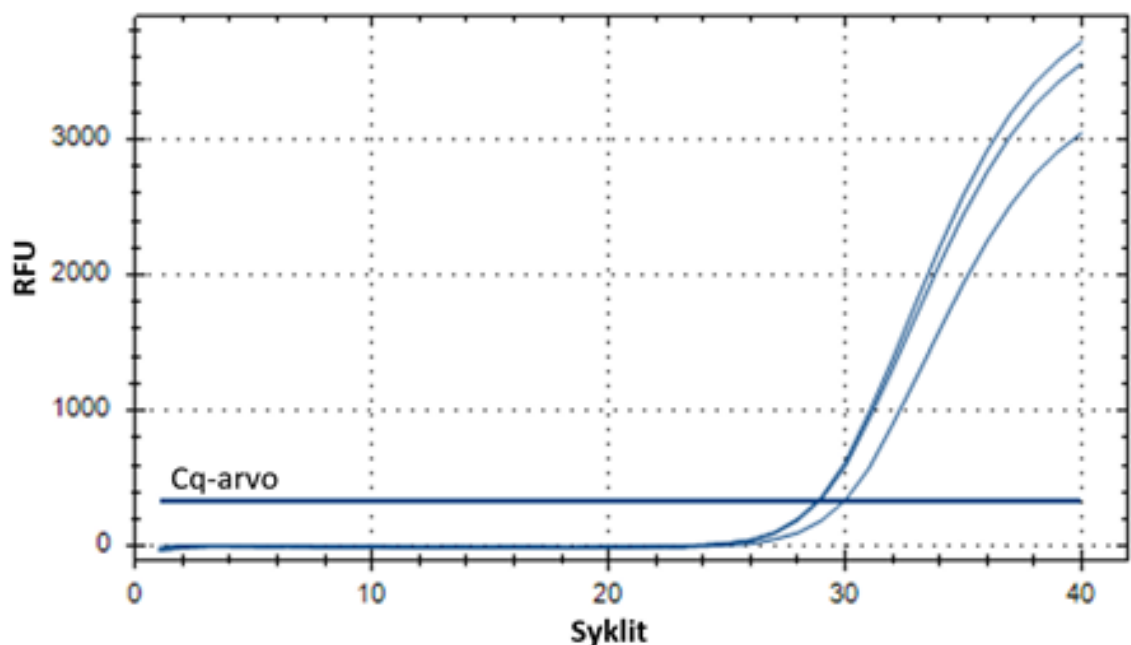
**Kuva 4.** Työssä käytetty qPCR-termosyklerin ohjelma.

qPCR-termosyklerin ohjelma. Ensimmäisessä vaiheessa DNA-polymeraasi aktivoidaan +95 °C:ssa kolme minuuttia. Toisessa vaiheessa DNA denaturoidaan +95 °C:ssa 15 sekuntia. Kolmannessa vaiheessa alukkeet pariutuvat DNA:han ja DNA-polymeraasi syntetisoi vastinjuosteen templaatti-DNA:lle +60 °C:ssa (1 minuutti). Toinen ja kolmas vaihe toistuvat yhteensä 40 kertaa.

Opinnäytetyössä haluttiin käyttää passiivista referenssiväriä ROX (6-karboksi-X-rodamiini) tulosten normalisointiin. ROX pienentää Cq-arvojen välisiä eroja triplikaattien välillä, jos niissä on eri tilavuus nestettä. (Normalization of Real-Time PCR Fluorescence Data with ROX Passive Reference Dye. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)) ROX sisältyy tutkittavaan pakkaukseen *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit* mutta sen käyttöä ei edellytetä *Bio-Rad CFX* -sarjan termosyklereissä (Product Information Sheet. hPSC Genetic Analysis Kit. [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)).

## 2.6 Raakadatan käsittely

Raakadata käsiteltiin *Bio-Rad CFX Manager™ 3.1* -ohjelmalla. Ohjelma esittää kuvaajana templaatti-DNA:n monistumisen, kun PCR-reaktio etenee (Kuva 5). Kuvassa 5 nähdään suhteellinen fluoresenssiyksikkö (RFU) PCR-syklien funktiona. RFU vastaa monistuvan templaatti-DNA:n määrää, jonka laite havaitsee fluoresenssina. Ohjelma piirtää



**Kuva 5.** *CFX Manager* -ohjelman tyypillisesti piirtämä kuvaaja yhdelle triplikaatille.



jokaiselle PCR-levyn kaivolle oman käyränsä ja laskee yksilöllisen Cq-arvon, kun kyn-nysarvo (sininen vaakaviiva) ylittyy. (Instruction manual. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)) Raakadata analysoitiin siten, että jokaisen triplikaatin käyriä verrattiin keskenään ja joukosta poikkeava käyrä poistettiin analyysistä. Esimerkiksi kuvassa 5 oleva alin käyrä, joka saavuttaa Cq-arvon PCR-syklissä 30, olisi hylätty. Ohjelmalla käsitelty raakadata (Cq-arvot) siirrettiin edelleen Exceliin.

## 2.7 Karyotyyppimuutosten määrittäminen

Karyotyyppimuutokset määritettiin näytteistä selainpohjaisella ohjelmalla *Stemcell Technologies™ Genetic Analysis Tool*. Ohjelma sisältyy valmiina tässä opinnäytetyössä tutkittavaan testiin *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit*. Ohjelmaan siirrettiin valmiiksi käsitelty raakadata Excelistä niin, että Cq-arvot oli ilmoitettu kolmen desimaalin tarkkuudella. Ohjelma laski karyotyyppimuutokset automaattisesti ja ilmoitti tulokset sekä pylväskaavioina että sanallisesti. Tulokset käsiteltiin vielä sopivampaan muotoon Excelillä.

## 2.8 Tulosten tilastollinen testaus

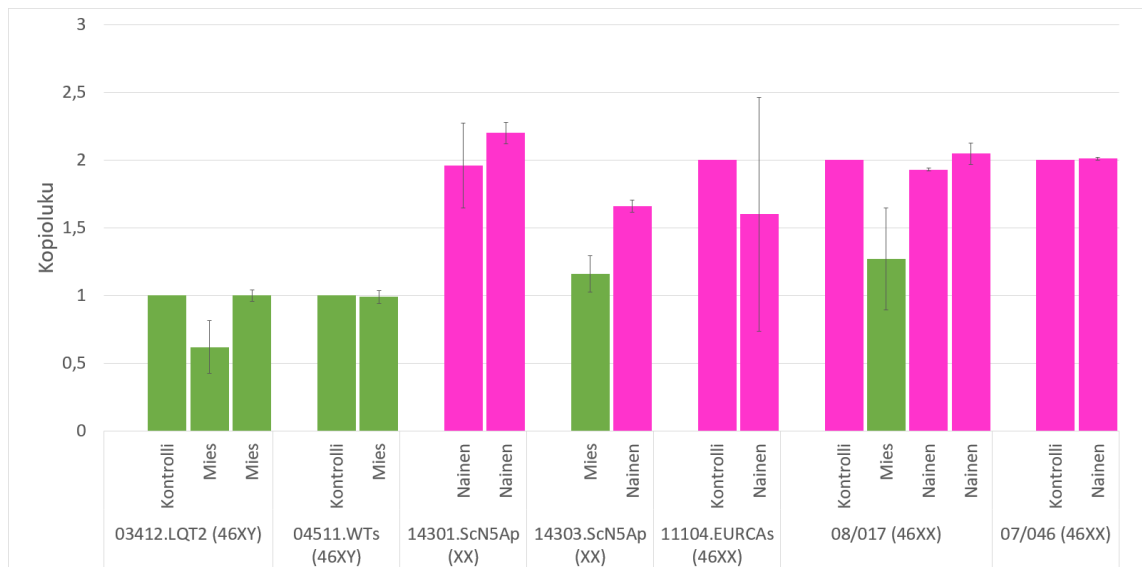
Tilastollinen testaus suoritettiin *SPSS-ohjelmalla* Fisherin tarkalla testillä. Aluksi tilastollinen testaus suoritettiin Khiin neliö -testillä ( $\chi^2$ -testi), joka perustuu kategoristen muuttujien ristiintaulukoinnista laskettavaan  $\chi^2$ -testisuureeseen sekä testisuureen p-arvoon. Khiin neliö -testissä käytettiin kategorisia muuttujia ”testitulos” ja ”karyotyyppimuutos”, jotka olivat joko positiivisia tai negatiivisia. Koska 2x2 taulukossa oli alle viiden suuruisia odotettuja lukumääriä vastoin Khiin neliö -testin käyttöedellytyksiä, suoritettiin tilastollinen testaus Fisherin tarkalla testillä.

Tulosten analysoinnissa pakkauksen kontrolli-DNA toimi negatiivisena kontrollina, joka ei sisältänyt karyotyyppimuutoksia. Aikaisemmin määritetyt näytteet toimivat positiivisena kontrollina, jotka sisälsivät tiedettyjä karyotyyppimuutoksia. Oleellisia mittareita kaupallisen testin toiminnan arvioimiseksi olivat testin tarkkuus ja herkkyys sekä negatiivinen ja positiivinen ennustearvo sillä tutkimusryhmän kannalta on oleellista tunnistaa ja poissulkea karyotyyppimuutokset luotettavasti.

### 3. TULOKSET

Kaupallinen testi tunnisti solulinjoista karyotyyppimuutoksia, jotka olivat toistettavissa seuraavissa määrittämissä. Myös sukupuolen määrittäminen solulinjoista onnistui hyvin. Vain yksi näyte hylättiin 13 näytteen otoksesta. Muiden näytteiden tuloksia voidaan pitää luotettavina sillä jokaisessa viidessä karyotyyppimäärittämissä negatiiviset kontrolli-DNA:t olivat normaaleita.

Kuvassa 6 ja taulukossa 2 on esitetty solulinjakohtaiset sukupuolen määrittämissä tulokset. Voidaan todeta, että kaupallinen testi tunnisti joka kerta oikein molempien miespuolisten solulinjojen 03412.LQT2 (p49) ja 04511.WTs (p24) sukupuolen. Naispuolisista solulinjoista sukupuoli todettiin joka kerta oikein kolmelta solulinjalta: 14301.ScN5Ap (p50), 11104.EURCAs (p28) ja 07/046 (p64). Testi tunnisti sukupuolen yhden kerran virheellisesti naispuolisesta solulinjasta 14303.ScN5Ap (p50) mutta tunnisti sukupuolen myös kerran oikein. Myös naispuolinen solulinja 08/017 (p26) tunnistettiin kerran väärin, mutta myös kaksi kertaa oikein. Kaiken kaikkiaan sukupuoli todettiin oikein 10/12 kertaa (83,3 %).

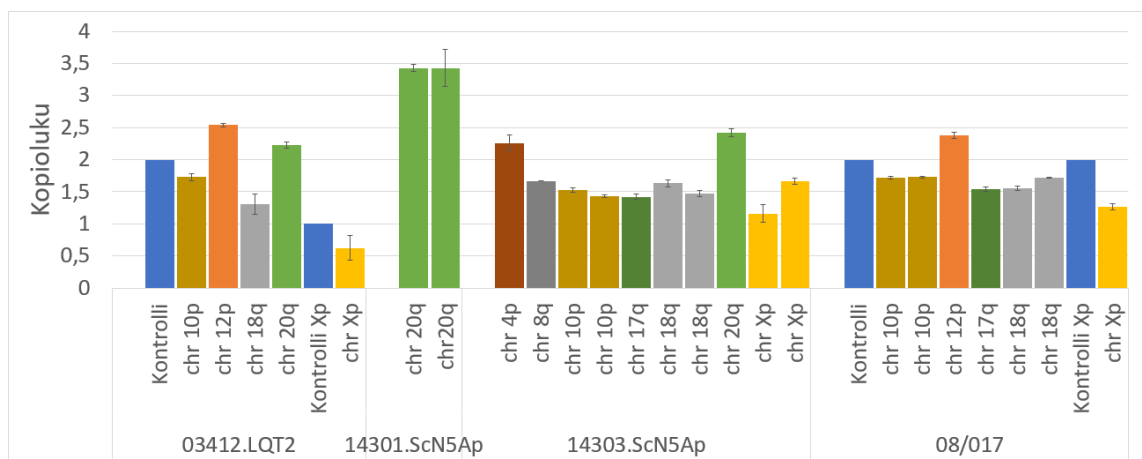


**Kuva 6.** Solulinjakohtaiset sukupuolen määrittämissä tulokset.

**Taulukko 2.** Solulinjakohtaiset sukupuolen määrittysten tulokset.

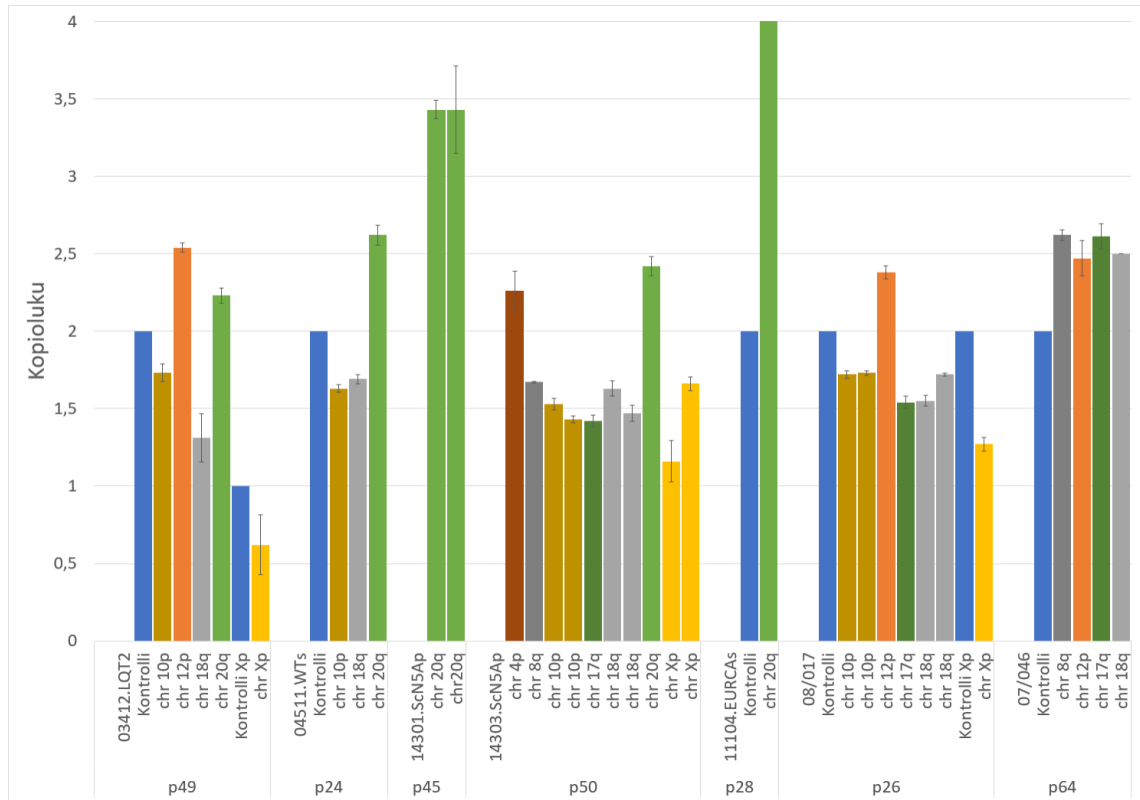
Solulinja	Sukupuoli	Sukupuolen määrittys			Yhteensä
03412.LQT2 (p49)	mies (XY)	XY	XY		2/2
04511.WTs (p24)	mies (XY)	XY			1/1
14301.ScN5Ap (p45)	nainen (XX)	XX	XX		2/2
14303.ScN5Ap (p50)	nainen (XX)	<b>XY</b>	XX		1/2
11104.EURCAs (p28)	nainen (XX)	XX			1/1
08/017 (p26)	nainen (XX)	<b>XY</b>	XX	XX	2/3
07/046 (p64)	nainen (XX)	XX			1/1
					10/12 (83,3 %)

Karyotyyppimäärittysten tulokset olivat toistettavissa 66,7 prosenttisesti (54/81) (Kuva 7). Karyotyypit määritettiin kaksi kertaa solulinjoista 03412.LQT2 (p49), 14301.ScN5Ap (p45) ja 14303.ScN5Ap (p50) sekä kolme kertaa solulinjasta 08/017 (p26). Muiden solulinjojen karyotyyppi määritettiin kerran. Kuvassa 7 on esitetty solulinjakohtaiset karyotyyppimuutokset eri määrittelyissä niillä solulinjoilla, jotka määritettiin kaksi tai kolme kertaa. Solulinjassa 03412.LQT2 (p49) havaittiin kromosomien 10p, 18q ja Xp deleetiot sekä kromosomien 12p ja 20q amplifikaatiot mutta tulokset eivät olleet toistettavissa molemmissa määrittelyissä. Solulinjassa 14301.ScN5Ap (p45) todettiin kromosomin 20q amplifikaatio molemmissa määrittelyissä. Solulinjassa 14303.ScN5Ap (p50) todettiin kromosomien 10p, 17q, 18q ja Xp deleetiot sekä ensimmäisessä että toisessa karyotyyppimäärittelyssä. Lisäksi havaittiin kromosomien 4p ja 20q amplifikaatiot ja kromosomin 8q deleetio mutta tulokset eivät olleet toistettavissa molemmissa määrittelyissä. Solulinjassa 08/017 (p26) todettiin kromosomien 10p ja 18q deleetiot kahdessa määrittelyssä.

**Kuva 7.** Karyotyyppimäärittysten toistettavuus.

Lisäksi havaittiin kromosomin 12p amplifikaatio ja kromosomien 17q ja Xp deleetio mutta tulokset eivät olleet toistettavissa muissa solulinjan määrityksissä.

Kaupallisella testillä todettiin 80 % (4/5) testillä havaittavissa olevista karyotyyppimuutoksista. Lisäksi todettiin 16 muuta karyotyyppimuutosta, joita ei ollut havaittu Turussa tehdyissä määrityksissä. Kaikki todetut karyotyyppimuutokset on koottu kuvaan 8.



**Kuva 8.** Kaikki todetut karyotyyppimuutokset.

On mahdollista, että tutkimukseen liittyy valikoitumisharha, jossa tutkimukseen valittujen solulinjojen korkeat siirrostusluvut ovat lisänneet karyotyyppimuutosten esiintyvyyttä eikä niistä ollut tietoa. Taulukossa 3 on esitetty yhteenvetona todetut karyotyyppimuutokset ja aikaisemmin Turussa samoista solulinjoista määritetyt karyotyyppimuutokset. Erityisesti kannattaa kiinnittää huomiota siirrostuslukuihin (passage-luku), jotka eivät ole solunäytteiden välillä täysin vertailukelpoisia. Esimerkiksi solulinjassa 03412.LQT2 on 20 siirrostusluvun ero verrattaessa tutkittuja näytteitä ja Turun sekä silmäryhmän näytteitä, mikä voi selittää karyotyyppimuutosten lisääntymisen. Oikeat todetut karyotyyppimuutokset olivat kromosomin 20q amplifikaatio solulinjassa 11104.EURCAs (p28) sekä kromosomien 8q, 12p ja 18 amplifikaatiot solulinjassa 07/046 (p64). Ainoa havaitsematta jäänyt karyotyyppimuutos oli kromosomissa X solulinjassa 07/046 (p64). Osa solulinjoissa esiintyvistä karyotyyppimuutoksista jäi havaitsematta siksi, että testi ei sisältänyt näiden muutosten havaitsemiseen sopivia aluke-koettimia. Karyotyyppimuutokset jäivät

**Taulukko 3.** Yhteenvetotaulukko solulinjoissa todetuista karyotyypimuutoksista.

Tutkittava solu-linja	Aiemmin havaittu karyotyypimuutos	Pas-sage	Kitillä todettu karyotyypimuutos	Pas-sage
03412.LQT2	normaali karyotyyppi	P29	chr 12p amplifikaatio chr 18q ja Xp deleetio	P49
04511.WTs	normaali karyotyyppi	P30	chr 20q amplifikaatio	P24
14301.ScN5Ap	*	*	chr 20q amplifikaatio	P45
14303.ScN5Ap	*	*	chr 4p ja 20q amplifikaatio chr 8q, 10p, 17q, 18q ja Xp deleetio	P50
11104.EURCAs	chr20q1 amplifikaatio	P27	chr 20q amplifikaatio	P28
08/017	chr10q ja chrXq deleetio	P23	chr 10p, 18q ja Xp deleetio chr 12p amplifikaatio	P26
07/046	chr 3, 5, 7, 8, 12, 18, X muutos	P58	chr 8q, 12p, 17q ja 18q amplifikaatio	P64

\*Karyotyyppiä ei ole aiemmin määritetty.

havaitsematta solulinjasta 08/017 (p26), jossa oli kromosomien 10q ja Xq deleetio, ja solulinjasta 07/046 (p64), jossa oli kromosomien 3, 5 ja 7 karyotyypimuutos.

Tilastollista testausta varten taulukkoon 4 koottiin kaupallisella testillä havaitut karyotyypimuutokset sen perusteella, oliko karyotyypimuutoksia tunnistettu aikaisemmin. Karyotyypit määritettiin yhteensä 72 kromosomista, joista kaupallinen testi tunnsti yhteensä 20 karyotyypimuutosta. Karyotyypimuutoksista 4 oli aiemmin tunnistettuja ja 16 oli tuntemattomia muutoksia. Negatiivisen testituloksen sai yhteensä 52 kromosomia.

**Taulukko 4.** Nelitaulukointi tilastollista testausta varten.

	Karyotyypimuutos	Ei-karyotyypimuutosta	
<b>Testi+</b>	4	16	yht. 20
<b>Testi-</b>	1	51	yht. 52
	yht. 5	yht. 67	yht. 72

Negatiivisen testituloksen saaneista kromosomeista yhdessä oli aikaisemmin tunnistettu karyotyypimuutos ja 51 kromosomia vahvistettiin karyotypeiltään normaaleiksi aiempien Turussa tehtyjen määritysten mukaisesti.

Kaupallisen testin tilastollinen merkitsevyys testattiin taulukon 4 tietojen perusteella *SPSS-ohjelmalla* Fisherin tarkalla testillä:  $p = 0,0191$ . Kaupallisen testin herkkyydeksi todettiin 80,0 % (4/5), tarkkuudeksi 76,1 % (51/67), positiiviseksi ennustearvoksi (PPV) 20,0 % (4/20) ja negatiiviseksi ennustearvoksi (NPV) 98,1 % (51/52).

## 4. POHDINTA

Tutkimustulokset olivat pääasiassa hyviä ja odotetun kaltaisia. Taulukossa 5 on esitetty tiiviinä yhteenvedona tärkeimmät tulokset, joista merkittävimpana voidaan todeta tulosten tilastollinen merkitsevyys ( $p < 0,05$ ). Taulukosta 5 nähdään hyvät tulokset herkkyyden, negatiivisen ennustearvon, tulosten toistettavuuden ja sukupuolimääritysten osalta. Tyydyttävä tulos saatiin kaupallisen testin tarkkuudesta. Parantamisen varaa jäi positiivisen ennustearvon osalta, joka todettiin matalaksi. Kaiken kaikkiaan kaupallinen testi *Stemcell Technologies™ hPSC Genetic Analysis Kit* voidaan kuitenkin todeta toimivaksi hiPSC-solulinjojen karyotyypimäärittämisessä.

**Taulukko 5.** Yhteenveto tärkeimmistä tuloksista.

Tunnusluku	Tulos	Viitearvo
otos/näyte	13/12	
tilastollinen merkitsevyys	$p = 0,0191$	$p < 0,05$
herkkyys	80,0 % (4/5)	
tarkkuus	76,1 % (51/67)	
positiivinen ennustearvo	20,0 % (4/20)	6,9 % (5/72)
negatiivinen ennustearvo	98,1 % (51/52)	93,1 % (67/72)
tulosten toistettavuus	66,7 % (54/81)	
sukupuolimääritykset	87,5 % (7/8)	

Tutkimuksen otos/näytekokoon on pieni (13/12), mikä altistaa tutkimuksen otantavirheelle. Otantavirhe pyrittiin kuitenkin minimoimaan valitsemalla mahdollisimman laajasti perusjoukkoa kuvaavia solunäytteitä. Tutkimukseen valittiin solunäytteitä, jotka sisälsivät tunnettuja karyotyypimuutoksia ja solunäytteitä, jotka oli todettu karyotyypeiltään normaaleiksi. Lisäksi valittiin kaksi solunäytettä, joissa oli todettu karyotyypimuutoksia ja joiden tunnistamiseksi tarvittavat aluke-koettimet puuttuivat kaupallisesta testistä. Otantavirheen selvittämiseksi tulokset testattiin tilastollisesti SPSS-ohjelmalla Fisherin tarkalla testillä. Tulokset todettiin tilastollisesti merkitseviksi ( $p < 0,05$ ), mikä sulki pois otantavirheen. P-arvon perusteella voidaan sanoa, että on vain 1,91 prosentin todennäköisyys, että poikkeama nollahypoteesista – se, että kaupallisella testillä havaitaan karyotyypimuutoksia – voidaan selittää pelkästään otantavirheellä. Yleisesti hyväksyttävänä rajana pidetään alle 5 prosenttia (Holopainen & Pulkkinen. 1999), joka alittui selvästi.

Vain yksi näyte jouduttiin hylkäämään 13 näytteen otoksesta. Solulinjan 11104.EURCAs (p28) jälkimmäinen näyte hylättiin, koska näytteen laatua tarkkailevassa kontrollikromosomissa 4p havaittiin epätavallisen suuri keskihajonta toisessa karyotyypimäärityksessä. Suuri keskihajonta on voinut aiheutua pipetointivirheestä tai DNA-eristyksen aikana tapahtuneesta virheestä.

Hyviä tuloksia saatiin herkkyiden, negatiivisen ennustearvon, tulosten toistettavuuden ja sukupuolen määrityksen osalta. Tyydyttävä tulos saatiin tarkkuudesta. Herkkyys on tärkein tutkimuksessa mitattava testisuure, joka kuvaa kaupallisen testin kykyä löytää karyotyypimuutoksia. Testi tunnisti 4/5 (80,0 %) aikaisemmin määritettyä karyotyypimuutosta solunäytteistä. Kaupallisella testillä voidaan siis suhteellisen luotettavasti poissulkea karyotyypimuutos, mikäli testitulos on negatiivinen. Erinomainen negatiivinen ennustearvo (98,1 %) tukee testin herkkyyttä ja kuvaa sitä, kuinka todennäköisesti solulinjan karyotyyppi on normaali, jos testitulos on negatiivinen. Testin hyöty on 5,0 %-yksikköä, sillä ilman testiä normaalin karyotyypin negatiivinen ennustearvo 93,1 prosenttia. Hyvän negatiivisen ennustearvon lisäksi karyotyypimääritysten toistettavuus (reliabiliteetti) on hyvä. Karyotyypit määritettiin kahdesti 3:sta solulinjasta, 03412.LQT2, 14301.ScN5Ap ja 14303.ScN5Ap, ja kolmesti solulinjasta 08/017. Tulokset eri määritysten välillä vastasivat toisiaan 66,7 prosenttisesti (54/81). Tulos on hyvä, sillä se perustuu *Stemcell Technologies™ Genetic Analysis Tool* -ohjelman esittämään arvioon karyotyypimuutoksista. Ohjelma jättää huomiotta vähäiset karyotyypimuutokset, ilmeisesti alle 0,25 yksikön muutokset kromosomin kopioluvussa. Esimerkiksi solulinjan 08/017 kromosomissa 1q kopioluvut olivat 1,81, 1,82 ja 1,88, jolloin ohjelma luokitteli karyotyypin normaaliksi kromosomin 1q osalta.

Sukupuolen määrityksissä testi tunnisti sukupuolen oikein 10/12 kertaa (83,3 %). Väärin tunnistetulla solulinjalla 14303.ScN5Ap oli korkea siirrostusluku (p50), mikä on voinut aiheuttaa pitkäikäisissä solulinjoissa yleisesti esiintyvän Xp-kromosomin deleetion, ja siksi testi tunnisti sukupuolen yhden kerran mieheksi. Solulinja 08/017 (p26), jonka sukupuolen kaupallinen testi tunnisti myös yhden kerran mieheksi, tunnistettiin myöhemmissä karyotyypimäärityksissä kaksi kertaa oikein naiseksi. Kaupallisen testin heikkous onkin, että se käyttää sukupuolen tunnistamiseen vain Xp-kromosomin kopiolukua. Koska Y-kromosomia ei oteta määrityksissä huomioon, sukupuolen määrittäminen ei ole aukotonta.

Tyydyttäväksi tulokseksi todettiin kaupallisen testin tarkkuus 76,1 % (51/67). Tarkkuus kuvaa negatiivisen testituloksen esiintyvyyttä karyotypeiltään normaaleilla solulinjoilla. Testillä voidaan varmistaa normaali karyotyyppi solulinjasta tyydyttävällä luotettavuudella, mikäli solulinjan karyotyyppi tiedetään entuudestaan.

Parantamisen varaa jäi testin positiivisen ennustearvon osalta, joka todettiin matalaksi (20,0 %). Testillä todettiin yhteensä 20 karyotyypinmuutosta sekä 12 karyotyypinmuutosta solulinjoista 14301.ScN5Ap ja 14303.ScN5Ap. Neljästä karyotyypinmuutoksesta löytyi tieto tutkimusryhmän tietokannasta. Testi myös tunnisti karyotyypinmuutoksia näytteistä, joiden karyotyyppi oli aikaisemmin määritetty normaaliksi. Tämä selittyy todennäköisesti sillä, että tähän tutkimukseen valittujen solulinjojen siirrostusluvut olivat korkeampia kuin aiemmissa määrittelyissä. Esimerkiksi solulinjan 03412.LQT2 karyotyyppi oli määritetty normaaliksi siirrostusluvussa p29 mutta tässä opinnäytetyössä oli käytössä sama solulinja siirrostusluvulla p49, mikä lisää riskiä karyotyypinmuutoksille. Muita korkean siirrostusluvun solulinjoja olivat 14301.ScN5Ap (p45), 14303.ScN5Ap (p50) ja 07/046 (p64), joissa kaikissa todettiin useita karyotyypinmuutoksia. Uusia karyotyypinmuutoksia todettiin myös pääasiassa Turun näytteitä suuremmilla siirrostusluvuilla. Toisaalta, näytteessä 04511.WTs esiintyi karyotyypinmuutos, kromosomin 20q amplifikaatio, jota Turussa ei ollut havaittu, vaikka siellä tutkitavan näytteen siirrostusluku oli suurempi (p30 ja p24). Karyotyypinmuutoksen esiintymisen voi selittää se, että matala siirrostusluku ei sulje pois karyotyypinmuutoksen syntymistä. Karyotyypinmuutokset toki lisääntyvät siirrostusluvun kasvaessa mutta monet muutkin tekijät vaikuttavat, kuten soluviljely feeder-free-menetelmällä tai entsyymittainen siirrostus. Karyotyypinmuutoksia voi syntyä myös sulatus/pakastusprosessissa, mikä koskee erityisesti tätä opinnäytetyötä, sillä käytettävissä ei ollut samoja näytteitä kuin Turussa vaan ainoastaan pakastettuja soluja aikaisemman siirrostusluvun läheltä. Lisäksi kromosomin 20q amplifikaatio on yleisimpiä karyotyypinmuutoksia hiPSC-viljelmissä, joten sen esiintyminen ei ole poikkeuksellista.

Mikäli tulevaisuudessa tehdään jatkotutkimuksia, joissa kaupallista testiä halutaan verrata toiseen karyotyypinmuutoksenmenetelmään, niissä olisi suositeltavaa käyttää saman siirrostusluvun solunäytteitä, jotta valikoitumisharha voidaan välttää.



## LÄHTEET

Amps K, Andrews P.W, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, ym. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29, 1132–1144.

Bai Q, Ramirez J.M, Becker F, Pantesco V, Lavabre-Bertrand T, Hovatta O, ym. (2015). Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 24:653–662.

Baker D, Hirst A.J, Gokhale P.J, Juarez M.A, Williams S, Wheeler M, ym. (2016). Detecting genetic mosaicism in cultures of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 7, 998–1012.

Ben-David U, Arad G, Weissbein U, Mandefro B, Maimon A, Golan-Lev T, ym. (2014). Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4825.

Beroukhim R, Mermel C.H, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, ym. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 18;463(7283):899-905.

Boom R, Sol C.J, Salimans M.M.M, Jansen C.L, Wertheim-Van Dillen P.M.E, Van Der Noordaa J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology.* 28(3), 495–503.

Catalina P, Montes R, Liger G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, ym. (2008). Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Mol Cancer* 7:76.

Draper J.S, Smith K, Gokhale P, Moore H.D, Maltby E, Johnson J, ym. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 53–54.

Engle S.J, Blaha L, Kleiman R.J. (2018). Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron* 100(4), 783–797.

Fazeli A, Liew C.G, Matin M.M, Elliott S, Jeanmeure L.F, Wright P.C, ym. (2011). Altered patterns of differentiation in karyotypically abnormal human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 175–180.

Garitaonandia I, Amir H, Boscolo F.S, Wambua G.K, Schultheisz H.L, Sabatini K, ym. (2015). Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS One.* 10:e0118307.

Hilz H, Wieggers U, Adamietz P. (1975). Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins. *Eur. J. Biochem.* 56, 103–108.

Holopainen M & Pulkkinen P. (1999) Tilastolliset menetelmät. WSOY. 91. ISBN 951-35-5629-8.

hPSC Genetic Analysis Kit. Overview. Saatavissa: <https://www.stemcell.com/products/hpsc-genetic-analysis-kit.html#section-product-documents> [Viitattu 29.5.2019]

Instruction manual. CFX96 Touch™, CFX96 Touch Deep Well™, CFX Connect™, and CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems. Saatavissa: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10021337.pdf> [Viitattu 5.6.2019]

Kankuri E, Harjula A, Pätilä T, Penttinen K, Aalto-Setälä K. (2014) Kantasoluista sykkiviä sydänsoluja. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 130(19):2001-8

Kubista M, Andrade J.M, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, ym. (2006). Molecular Aspects of Medicine 27, 95–125.

Lääketieteen sanasto. Diploidi(nen). Saatavissa: [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltt00562](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00562) [Viitattu 29.5.2019]

NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. Saatavissa: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf> [Viitattu 4.6.2019]

Normalization of Real-Time PCR Fluorescence Data with ROX Passive Reference Dye. Saatavissa: <http://www.bio-rad.com/en-st/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye?ID=MW472W15#1> [Viitattu 5.6.2019]

Olariu V, Harrison N.J, Coca D, Gokhale P.J, Baker D, Billings S, ym. (2010). Modeling the evolution of culture-adapted human embryonic stem cells. Stem Cell Res. 4, 50–56.

Product Information Sheet. hPSC Genetic Analysis Kit. Saatavissa: [https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/DX22330-PIS\\_1\\_2\\_0.pdf?\\_ga=2.58896367.358521143.1559816788-1220257932.1553689300](https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/DX22330-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.58896367.358521143.1559816788-1220257932.1553689300) [Viitattu 6.6.2019]

qPCR Guide. Saatavissa: <https://www.gene-quantification.de/eurogentec-qPCR-guide.pdf> [Viitattu 29.5.2019]

Sydänryhmä. Tietoa tutkimusryhmästä. Saatavissa: <http://www.uta.fi/bmt/institute/research/aalto-setala/indexfi.html> [Viitattu 29.5.2019]

Taapken S.M, Nisler B.S, Newton M.A, Sampsell-Barron T.L, Leonhard K.A, McIntire E.M, ym. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 29, 313–314.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K ym. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131,861–872.

Tenhunen J, Ulmanen I, Ylännä J: Biologia. (2004). Geeni ja biotekniikka. WSOY 6.painos,161. ISBN 951-0-28293-6.

User Manual. Genomic DNA from tissue. Saatavissa: [https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNATissueXS.pdf](https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNATissueXS.pdf) [Viitattu 6.6.2019]

Wang T-L, Maierhofer C, Speicher M.R, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler K.W, ym. (2002). Digital karyotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(25), 16156-16161.

Weltner J, Trokovic R, Otonkoski T. (2014) Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. 130(8):785-92.

Werbowsky-Ogilvie T.E, Bosse M, Stewart M, Schnerch A, Ramos-Mejia V, Rouleau A, ym. (2009). Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat. Biotechnol.* 27, 91–97.

Yang S, Lin G, Tan Y.Q, Zhou D, Deng L.Y, Cheng D.H ym. (2008). Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. *Genes Chromosomes Cancer*. 47, 665–679.

Zheng Y. Some ethical concerns about human induced pluripotent stem cells. (2016) *Sci Eng Ethics*. Epub. 22(5):1277–1284.